Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. D. Klaus

UNTERSUCHUNGEN ÜBER INSULIN ABBAUENDE AKTIVITÄTEN IN LEBER-, MUSKEL-, MILZ- UND NIERENGEWEBE DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

CLAUDIA KAMPS
aus Neersen/Rhld.

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. D. Klaus

UNTERSUCHUNGEN ÜBER INSULIN ABBAUENDE AKTIVITÄTEN IN LEBER-, MUSKEL-, MILZ- UND NIERENGEWEBE DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

CLAUDIA KAMPS

aus Neersen/Rhld.

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg/Lahn am 26.9.1975

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Priv. Doz. Dr. med. L. Hausmann
Correferent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

Untersuchungen über Insulin abbauende Aktivitäten in Leber-, Muskel-, Milz- und Nierengewebe der Ratte[+)]

UNIV. LEIDEN BIBL.

[+)] Experimente abgeschlossen: Februar 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Geschichte des Insulins	1
1.2. Entdeckung und Bedeutung des Proinsulins	1
1.3. Die Bestimmung und Messung des Proinsulins	2
1.4. Fragestellung	3
2. Materialien und Methoden	4
2.1. Herstellung der Organhomogenate mit insulinspezifischer Aktivität	4
2.2. Radioimmunologische Insulin- und Proinsulinbestimmung	4
2.3. Versuchsanordnung	6
2.3.1. Messung von insulinabbauenden Aktivitäten in Homogenaten gegenüber Insulin im menschlichen Serum	6
2.3.2. Messung der insulinabbauenden Aktivität in Homogenaten gegenüber standardisierter Insulinlösung	6
2.3.3. Messung der insulinabbauenden Aktivität in Organhomogenaten gegenüber einer Proinsulinlösung	6
2.3.4. Messung der insulinabbauenden Aktivität in Organhomogenaten gegenüber einem Insulin-Proinsulin-Lösungsgemisch	7
2.4. Versuchsablauf	7
3. Ergebnisse	8
3.1. Insulinabbau im menschlichen Serum durch insulinabbauende Aktivitäten in Rattenorganhomogenaten	8
3.2. Insulinabbau in einer standardisierten Insulinlösung durch insulinabbauende Aktivitäten in Organhomogenaten	9
3.3. Proinsulinabbau in einer Proinsulinlösung durch auch proinsulinangreifende Aktivitäten in Organhomogenaten	10
3.4. Insulin- und Proinsulinabbau in einem Lösungsgemisch derselben durch insulin- und proinsulinabbauende Aktivitäten in Rattenorganhomogenaten	10
Tabellen 1 - 4	11a
Tabellen I - IV	11b
Abbildungen 3 - 6	11c-f

Seite

4. Diskussion 12
4.1. Wege des enzymatischen Insulinabbaus 12
4.1.1. Die Theorie der insulinspezifischen Protease 13
4.1.2. Die Theorie der insulinabbauenden Transhydrogenase 13
4.1.3. Diskussion über die verschiedenen Insulinabbautheorien anhand der Literatur 14
4.2. Eigene Beobachtungen über insulinspaltende Aktivitäten 15
4.2.1. Anwesenheit von insulinspaltenden Aktivitäten in vier Gewebs- und Organhomogenaten der Ratte 15
4.2.2. Konzentration der ISA in den Geweben 15
4.2.3. Angriff der 'insulinspezifischen Protease' auch auf Proinsulin 16
4.2.4. Die Bedeutung der Inkubationsdauer 16
4.2.5. Die Bedeutung der Enzymmenge 17
4.3. Vergleich eigener Ergebnisse mit denen der Literatur 17

5. Zusammenfassung und Ergebnis der Arbeit 20
5.1. Insulinabbauende Enzyme in verschiedenen Rattengeweben 20
5.2. Möglichkeit der Proinsulinbestimmung mit Hilfe insulinspaltender Enzyme 21

6. Literaturübersicht 22

Verzeichnis der Tabellen

Nr.	Text	Seite
1	IMM a) in reiner Insulinlösung und b) in Patientenserum vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37° C mit zentrifugiertem Milzhomogenat (25 µl).	11a
2	IMM a) in reiner Insulinlösung, b) in Patientenserum, c) in reiner Proinsulinlösung und d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37° C mit zentrifugiertem Leberhomogenat (25 µl).	11a
3	IMM a) in reiner Insulinlösung bzw. b) in Patientenserum vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37° C mit zentrifugiertem Nierenhomogenat (25 µl).	11a
4	IMM a) in reiner Insulinlösung, b) in Patientenserum, c) in reiner Proinsulinlösung und d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37° C mit zentrifugiertem Muskelhomogenat (25 µl).	11a
I	IMM a) in reiner Insulinlösung und b) in Patientenserum vor und nach Inkubation (37° C/15') bei Zugabe von Milzhomogenat in verschiedenen Mengen (25, 50, 100 µl).	11b
II	IMM a) in reiner Insulinlösung, b) in Patientenserum, c) in reiner Proinsulinlösung und d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach Inkubation (37° C/15') bei Zugabe verschiedener Mengen von Leberhomogenat (25, 50, 100 µl).	11b
III	IMM a) in reiner Insulinlösung und b) in Patientenserum vor und nach Inkubation (37° C/15') bei Zugabe verschiedener Mengen von Nierenhomogenat (25, 50, 100 µl).	11b

Nr.	Text	Seite
IV	IMM a) in reiner Insulinlösung, b) in Patientenserum, c) in reiner Proinsulinlösung und d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach Inkubation (37° C/15') bei Zugabe verschiedener Mengen von Muskelhomogenat (25, 50, 100 µl).	11b

Verzeichnis der Abbildungen

Nr.	Text	Seite
1	Immunologische Insulinbestimmung (Versuchsablauf)	5
2	Messung von insulinspaltenden Aktivitäten in Organgeweben (Versuchsablauf)	7a
3	Abbau des IMM in reiner Insulinlösung durch Leber- und Nierenhomogenat (oben) und in Patientenserum durch Muskel- und Milzhomogenat (jeweils 25 µl) nach verschieden langer Inkubation bei 37° C (5', 10', 15', 20' und 30').	11c
4	Abbau des IMM in reiner Humaninsulinlösung, in Patientenserum, in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch und in reiner Proinsulinlösung durch die verschiedenen Gewebshomogenate (Leber, Muskel, Milz, Niere) nach verschieden langer Inkubation bei 37° C (5', 10', 15', 20', 30').	11d
5	Abbau des immunologisch meßbaren Humaninsulins und des Proinsulins durch 25 µl Leber- und Muskelhomogenat nach verschieden langer Inkubationszeit (5', 10', 15', 20', 30').	11e
6	Abbau des IMM in den verschiedenen Lösungen (Insulinlösung, Patientenserum, Proinsulinlösung, Insulin-Proinsulin-Gemisch) durch die insulinabbauenden Aktivitäten in den verschiedenen Organhomogenaten bei gleicher Inkubationszeit aber verschieden großer Homogenatzugabe (25, 50, 100 µl).	11f
7	Schematische Darstellung der Wege des enzymatischen Insulinabbaus ((nach H. Thomas (48)).	12

Benutzte Abkürzungen

IMM	Immunologisch meßbares Material
IBR	Insulinbindungsreagenz
ISP	Insulin-Specific-Protease
NEM	N-Aethylmaleimid
GIT	Glutathion-Insulin-Transhydrogenase

1. Einleitung

1.1. Geschichte des Insulins

Insulin wurde 1922 von Banting und Best in Toronto entdeckt. 1955 erfolgte die vollständige Strukturaufklärung durch Sanger, und 1963 wurde es erstmals von drei unabhängig voneinander arbeitenden Gruppen: Du in China, Katsoyannis in den USA und Zahn in der Bundesrepublik Deutschland synthetisiert.

1.2. Entdeckung und Bedeutung des Proinsulins

Die Geschichte des Proinsulins, der einkettigen Vorstufe des Insulins, ist sehr viel jünger als die des Insulins. Es wurde 1967 zuerst von Steiner und Oyer (47) beschrieben, die die Biosynthese des Insulins in isolierten menschlichen Inselzelltumoren studierten. 1968 beschrieben Roth und Mitarbeiter (41) ein sogenanntes "Big insulin" und Rubinstein ein Proinsulin im menschlichen Urin und Serum (42). 1968 fanden Chance, Ellis und Bromer (8) die Aminosäuresequenz des Proinsulins heraus. Diese Entdeckungen weckten allgemein das Interesse an der Rolle und Wichtigkeit des Hormons Proinsulin im Stoffwechsel.
Man fand Proinsulin nicht nur im Pankreas (39), dem Syntheseort, sondern auch verschieden hoch konzentriert in der Peripherie (15, 33, 41, 42) und fragte sich, welche biologische Wirksamkeit dieses Prohormon wohl habe (6, 57, 14, 40). Laut Chance (9) ist es die wichtigste, wenn nicht sogar einzige Funktion des Prohormons in den B-Zellen des Pankreas, die A- und B-Ketten in die für die Knüpfung der Disulfidbrücken günstigste Stellung zu bringen und sie solange zu halten, bis die Bindung zustande gekommen ist. Seine Aufgabe in der Peripherie ist noch nicht klar, Melani (33) erhebt die Frage, ob es hier nur die passive Konsequenz des Insulinsynthesemechanismus ist, oder ob es auch spezifische Funktionen in den anderen Geweben hat. Man weiß bis jetzt nur, daß die biologische Aktivität des Proinsulins 2-20 % von der des Insulins beträgt (45). Die unterschiedlichen Werte ergeben sich aus den verschiedenen angewandten biologischen Bestimmungsverfahren.

1.3. Die Bestimmung und Messung von Proinsulin

Die Erforschung des Proinsulins war deswegen so schwierig, weil man einmal nicht ausreichende Mengen isolieren konnte (39), und zum anderen, weil die normalerweise im Organismus vorhandenen geringen Mengen schwer zu bestimmen waren.
Nach Steiner (45) zum Beispiel bestehen nur etwa 5 % des gesamten Pankreasinsulins aus Proinsulin und Intermediärformen. Melani und Mitarbeiter fanden bei gesunden nüchternen Patienten Serumproinsulinspiegel, die 5-48 % der Insulinkonzentration betrugen (33). Ansteigende Proinsulinspiegel fand man nach Glucosestimulation (41), höchste Spiegel bei Patienten mit Inselzelltumoren (16, 20, 30, 47).
Die bekannten Methoden der Proinsulinbestimmung waren aufwendig, langwierig und kompliziert. Da gab es zum Beispiel die Methode der elektrophoretischen Proinsulincharakterisierung (17) oder die der säulenchromatographischen Trennung (Gelfiltration) von Insulin und Proinsulin mit Polyacrylamid (28) [Bio-gel P-30 bei Melani (33) oder Sephadex G-50 bei Roth (41)], an die sich ein Radioimmunoassay jeder einzelnen eluierten Fraktion anschloß.
Ein Immunoassay für Proinsulin, ähnlich dem der radioimmunologischen Insulinbestimmung (s.u.), konnte nicht entwickelt werden, da es bisher nicht gelang, für menschliches Proinsulin spezifische Antikörper zu entwickeln (29, 34, 56). Dann aber veröffentlichte Brush 1971 eine Arbeit (2), in der er auf die Entdeckung von Mirsky's "Insulinase" (35) zurückgriff. Er beschrieb eine "Insulinspezifische Protease" in verschiedenen Rattengeweben, die Insulin in kürzester Zeit und fast vollständig zu immunochemisch nicht mehr meßbaren Komponenten abbaut, Proinsulin aber nicht angreift. Dieses Enzym wird durch Sulfhydrylreagentien wie z.B. NEM gehemmt, nicht aber durch den Inhibitor der Pankreasproteasen Phenylmethylsulfonylfluorid (2). Da Proinsulin und Insulin ähnliche immunologische Reaktionsbereitschaft auf Antiinsulinantikörper zeigen (33) konnte man nun mit Immunoassays vor und nach kurzer Inkubation den Anteil des Proinsulins in der zu messenden Probe bestimmen (26).

1.4. Fragestellung

Dieses von Brush beschriebene insulinspaltende Enzym erregte allgemeines Interesse, man fragte nach Wirkungsmechanismus und Verteilung. Es folgten innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Veröffentlichungen (3, 4, 5, 7, 21, 25, 26, 27, 32, 43, 48, 49, 50, 51, 55), und auch diese Arbeit soll sich mit der Aktivität und Verteilung dieses Enzyms in verschiedenen Organgeweben der Ratte beschäftigen. Dabei soll versucht werden, folgende Fragen zu beantworten:

a) In welchen Organen der Ratte kommen insulinabbauende Aktivitäten vor?

b) Welches Organgewebe besitzt die höchste insulinabbauende Aktivität?

c) Wieviel Insulin und wieviel Proinsulin wird abgebaut?

d) In welcher Zeit spalten die Gewebsextrakte mit insulinabbauender Aktivität bestimmte Insulinmengen?

e) Wieviel Gewebsextrakt (μl Lösung) braucht man, um möglichst viel Insulin in kurzer Zeit zu spalten?

2. Materialien und Methoden

2.1. Herstellung der Organhomogenate mit insulinspezifischer Aktivität

Für die Versuche wurden weiße männliche Wista-Ratten mit einem Gewicht von 160 - 200 g gebraucht. Die Tiere hatten bis zum Versuchstag Zugang zu Wasser und Futter.
Man tötet die Ratten durch Genickschlag und läßt sie ausbluten. Die herauspräparierten Gewebe (Milz, Leber, Nieren und Hinterbeinmuskeln) werden sorgfältig von Fett und Sehnen gesäubert und im 4° C Eisbad aufbewahrt. Alle weiteren Arbeitsschritte werden bei dieser Temperatur durchgeführt. Erfahrungsgemäß bleiben die empfindlichen Organfunktionen dabei am besten erhalten.
Die Gewebeteile werden dann jeweils in Mengen von 1,3 - 2,0 g mit 0,35 molarer Saccharoselösung im Verhältnis 1 : 4 je 5 x 10 sec homogenisiert.[x)]
Anschließend zentrifugiert man die Homogenate 60 min bei 100000 xg.[xx)] Der Bodensatz wird verworfen und der Überstand bis zur weiteren Bearbeitung portioniert in Eppendorfgefäßen bei -20° C eingefroren.

2.2. Radioimmunologische Insulin- und Proinsulinbestimmung

Die radioimmunologische Bestimmung des immunologisch meßbaren Materials wurde nach der sogenannten "Doppelantikörpermethode" nach Hales und Randle durchgeführt (18). Da Insulin und Proinsulin ähnliche immunologische Reaktionsbereitschaft zeigen (s.o.), kann man beide Hormone zusammen oder Proinsulin allein - nachdem Insulin durch ISP zerstört ist - in einer Probe bestimmen.
Die Methode beruht auf kompetitiver Hemmung der Bindung von J-125-Insulin an die Insulinantikörper (Insulinbindungsreagenz) durch das in der zu messenden Probe enthaltene Insulin. Die Menge des an den Insulinantikörper gebundenen J-125-Insulins verhält sich deshalb umgekehrt proportional zur Insulinkonzentration in der Probe.

---

x) Ultra Turrax Homogenisator, Firma Janke und Kunkel
xx) präparative Ultrazentrifuge, Firma Beckmann

Der Insulin-Insulinantikörper-Komplex wird durch einen zweiten Antikörper aus der Lösung gefällt. Das Präzipitat wird durch Filtration von dem freigebliebenen Insulin getrennt und seine Radioaktivität gemessen. Die zu messende Insulinkonzentration wird an einer mit bekannten Insulinkonzentrationen aufgestellten Eichkurve abgelesen (19). Wir benutzten: "Insulin Immunassay Kits", die ein durch einen zweiten Antikörper gefälltes Insulinbindungsreagenz (IBR), radioaktiv markiertes Insulin, standardisiertes Humaninsulin und passende Filter enthalten.[x)]

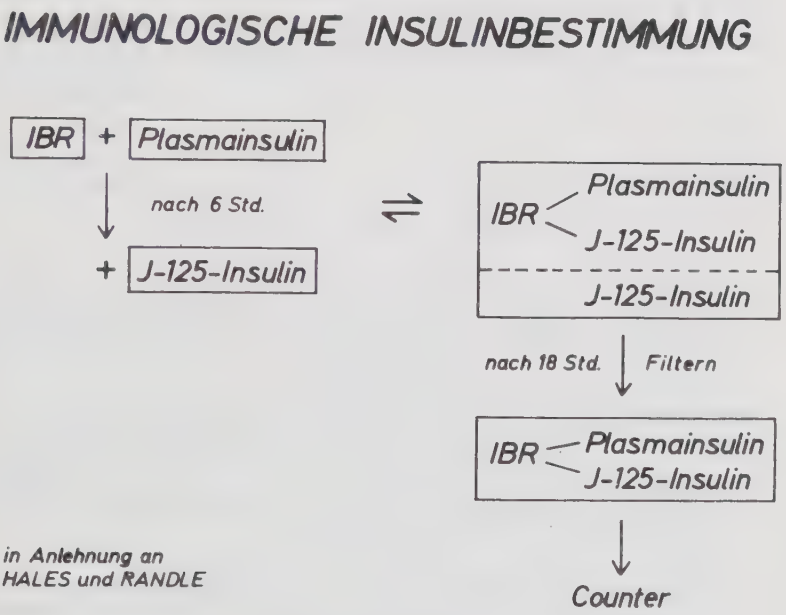

Abb. 1: Immunologische Insulinbestimmung (Versuchsablauf)

x) Firma Amersham, Buckinghamshire, England

2.3. Versuchsanordnung

Um die insulinspaltende Enzymaktivität in den verschiedenen Organgeweben der Ratte zu messen, wurden folgende Versuche gemacht:

2.3.1. Messung von insulinabbauenden Aktivitäten in Homogenaten gegenüber Insulin im menschlichen Serum

Eine bestimmte Menge Patientenserum (100 µl) wird mit 25 µl insulinspezifische Protease enthaltendem Homogenat der verschiedenen Organe (Leber, Muskel, Niere, Milz) verschieden lange inkubiert (5', 10', 15', 20', 30').
Bei einigen anderen Proben bleibt die Inkubationszeit gleich, nur die zum Serum zugegebene Menge an Organhomogenat wird geändert (25 µl, 50 µl, 100 µl).

2.3.2. Messung der insulinabbauenden Aktivität in Homogenaten gegenüber standardisierter Insulinlösung

Es werden wieder jeweils 25 µl der Organhomogenate zu 100 µl einer Insulinlösung gegeben, die gefriergetrocknetes, nach Angabe der Firma[x] "reines" Humaninsulin enthält, und von uns auf eine Insulinkonzentration von 100 µE/ml standardisiert wurde.
Bei einem Teil der Proben ist die Inkubationszeit variabel (5', 10', 15', 20', 30'), bei einem anderen Teil variiert die zugegebene Homogenatmenge (25 µl, 50 µl, 100 µl Homogenat), während die Inkubationszeit konstant 15' bleibt.

2.3.3. Menge der insulinabbauenden Aktivität in Organhomogenaten gegenüber einer Proinsulinlösung

Es wird zuerst 25 µl Organhomogenat zu 100 µl einer Lösung gegeben, die reines Schweineproinsulin[xx] in einer von uns gewählten Kon-

---

x) Firma Amersham, Buckinghamshire, England

xx) Firma Eli Lilly GmbH, Bad Homburg

zentration enthält. Dieses Gemisch wird verschieden lange inkubiert (5', 10', 15', 20', 30'). Dann wird bei gleicher Inkubationszeit (15') mit verschiedenen Mengen der Organhomogenate (25 µl, 50 µl, 100 µl) in 100 µl Proinsulinlösung experimentiert.

2.3.4. Messung der insulinabbauenden Aktivität in Organhomogenaten gegenüber einem Insulin-Proinsulin-Lösungsgemisch

Reines Schweineproinsulin und reines Humaninsulin wird in einem gewählten Verhältnis (3 : 5) gemischt. Zu 100 µl dieses Gemisches gibt man wieder 25 µl der verschiedenen Organhomogenate und inkubiert 5', 10', 15', 20' und 30'. Bei anderen Proben werden verschiedene Mengen der Organhomogenate zu dem Gemisch gegeben und 15' bei 37°C inkubiert.

2.4. Versuchsablauf

Man gibt zuerst 100 µl Patientenserum, bzw. Insulinlösung, bzw. Proinsulinlösung, bzw. Proinsulin-Insulin-Gemisch 3 : 5 in Eppendorfgefäße, fügt dann 25 µl, bzw. 50 µl, bzw. 100 µl Enzymlösung der verschiedenen Organe (Leber, Niere, Muskel, Milz) hinzu und rührt um.
Die Proben werden bei 37° C inkubiert und anschließend wird die Enzymaktivität durch Zugabe von 25 µl 0,01 molarem N-Aethylmaleimid (NEM) gestoppt.
Die jetzt noch vorhandenen Insulin- und Proinsulinmengen, die nicht von der "insulinspezifischen Protease" angegriffen wurden, werden mit der schon beschriebenen Methode (s.o.) gemessen.
Ausgangswert war jeweils eine nicht mit Homogenat inkubierte Probe.

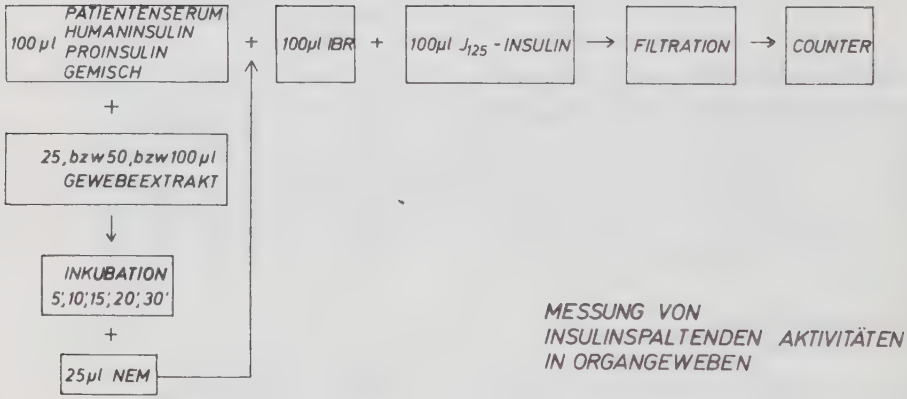

Abb. 2: Messung von insulinspaltenden Aktivitäten in Organgeweben (Versuchsablauf)

3. Ergebnisse

3.1. Insulinabbau im menschlichen Serum durch insulinabbauende Aktivitäten in Rattenorganhomogenaten

Das Blutserum wurde von nüchternen, stoffwechselgesunden Personen gewonnen, denen 100 g Glucoselösung oral zugeführt wurde. Die Blutentnahme erfolgte eine Stunde nach der Glucosezufuhr, da dann das Serum hohe Insulinspiegel enthält. Mit Leber- und Muskelhomogenat machten wir fünf Versuche (n = 5), bei Milz- und Nierenhomogenat waren es sechs Versuche (n = 6).
Als Ausgangswert, das heißt, das in µE/ml gemessene radioimmunologische Material (Insulin und Proinsulin) im Serum ohne Homogenatzusatz vor Inkubation, wurde bei den Versuchen mit Leberzentrifugat 75,7 µE/ml ermittelt, bei Muskelzentrifugat 72,5 µE/ml, bei Milzzentrifugat 60,3 µE/ml und bei Nierenzentrifugat 61,4 µE/ml (Mittelwerte). Aus den Tabellen 1 - 4 sind die einzelnen Werte für den Abfall des radioimmunologisch meßbaren Insulins nach 5', 10', 15', 20' und 30' abzulesen.
Der Ausgangswert wurde dann als 100 % der in der Probe meßbaren radioimmunologisch meßbaren Aktivität angesetzt und deren Abfall nach den verschiedenen Inkubationszeiten prozentual ausgerechnet. Siehe Abbildungen 3 und 4 und Tabellen 1 - 4b.
Das im Patientenserum enthaltene radioimmunologisch meßbare Material (Insulin, Proinsulin und Intermediärformen) wurde

von Leberhomogenat bis zu 15,4 %,
" Nierenhomogenat " " 17,9 %,
" Muskelhomogenat " " 20,1 %,
" Milzhomogenat " " 21,0 %

abgebaut (Abb. 4).
Bei den Versuchen mit wachsenden Homogenatmengen stellte sich heraus, daß durch eine Vergrößerung der zugeführten Homogenatmenge folgende Steigerung des Insulinabbaus einhergeht: Bei Muskelhomogenat von 35,3 % Restinsulin bei Inkubation mit 25 µl auf 23,7 % mit 100 µl. Das heißt eine Abbausteigerung von 11,6 %. Bei Nierenhomogenat von 22,8 % bei 25 µl auf 14,4 % bei 100 µl, das heißt Mehrabbau von 8,4 %. Bei Milzhomogenat von 25,7 % bei 25 µl auf

19,8 % bei 100 µl, das heißt Mehrabbau von 5,9 %. Bei Leberhomogenat von 21,1 % bei 25 µl auf 17,6 % bei 100 µl, das heißt Mehrabbau von 3,5 % (Abb. 6).

Organ	25 µl	50 µl	100 µl	Differenz 25 µl zu 100 µl
Muskel	35,3 %	31,4 %	23,7 %	11,6 %
Niere	22,8 %	17,7 %	14,4 %	8,4 %
Milz	25,7 %	21,9 %	19,8 %	5,9 %
Leber	21,1 %	19,0 %	17,6 %	3,4 %

3.2. Insulinabbau in einer standardisierten Insulinlösung durch insulinabbauende Aktivitäten in Organhomogenaten

Mit Leber-, Nieren- und Muskelhomogenat wurden jeweils fünf Versuche gemacht (n = 5), bei Nierenhomogenat waren es sechs Versuche (n = 6).

Ausgangswert für die Versuche, d.h. das in µE/ml IMM der jeweils bei Versuchsbeginn neu gemessenen, nicht inkubierten Insulinlösung, war bei

Leber	95,1	µE/ml
Milz	95,0	"
Niere	94,0	"
Muskel	99,9	" (Mittelwerte).

Der Abfall des radioimmunologisch meßbaren Insulins nach verschieden langen Inkubationszeiten in Originalmeßwerten und prozentual ausgerechnet ist wieder aus Tabellen 1 - 4a und Abbildungen 4 und 5 ersichtlich.

Bei den Versuchen mit wechselnder Inkubationsdauer ergibt sich folgender Insulinabbau (Tab. 1 - 4a):

Bei dreißigminütiger Inkubation mit Leberhomogenat ist bis auf 2,9 µE/ml alles Insulin abgebaut. Bei Nierenhomogenat ist bis auf 6,9 µE/ml, bei Muskelhomogenat bis auf 9,7 µE/ml, bei Milzhomogenat bis auf 10,9 µE/ml alles Insulin verschwunden.

Bei den Versuchen mit wachsenden Homogenatmengen ergibt sich folgendes (Tab. I - IVa):

Bei Milzhomogenat ist mit 25,6 % der ursprünglichen Aktivität bei 25 µl auf 26,3 % bei 100 µl keine Steigerung des Insulinabbaus zu

verzeichnen. Bei Leberhomogenat beträgt die Steigerung von 6,7 % bei 25 µl auf 3,4 % bei 100 µl eine Steigerung von 3,4 %; bei Muskelhomogenat von 18,8 % bei 25 µl auf 10,3 % bei 100 µl eine Steigerung von 10,3 % und bei Nierenhomogenat von 17,8 % bei 25 µl auf 6,8 % bei 100 µl eine Steigerung von 11,0 % (Abb. 6).

Organ	25 µl	50 µl	100 µl	Differenz von 25 µl auf 100 µl
Niere	17,8 %	10,5 %	6,8 %	11,0 %
Muskel	18,8 %	11,7 %	8,5 %	10,3 %
Leber	6,7 %	4,1 %	3,3 %	3,4 %
Milz	25,6 %	24,7 %	26,3 %	-

3.3. Proinsulinabbau in einer Proinsulinlösung durch insulinabbauende Aktivitäten in Organhomogenaten

Um zu überprüfen, ob, und wenn ja, wie stark Proinsulin von den Organhomogenaten mit insulinspaltender Aktivität angegriffen wird, wurde einer reinen Proinsulinlösung einmal Muskel- und dann Leberzentrifugat zugefügt. Ausgangswert, d.h. in µE/ml gemessenes Proinsulin vor Inkubation, war bei Leberzentrifugat 57,0 µE/ml, bei Muskelzentrifugat 60,5 µE/ml.
Von den 100 % Proinsulin vor der Inkubation waren nach 30' Inkubation vom Muskelgewebe 10,4 %, vom Lebergewebe 24,6 % des radioimmunologisch meßbaren Proinsulins zerstört worden (Tabellen 2c und 4c). Bei den Versuchen mit wachsenden Homogenatmengen betrug der Anteil des zerstörten Proinsulins bei 100 µl Muskelgewebe 2,7 %, bei 100 µl Lebergewebe 20,4 % (Tabellen IIc und IVc). Siehe Abbildungen 4, 5 und 6.

3.4. Insulin- und Proinsulinabbau in einem Lösungsgemisch derselben durch insulin- und proinsulinabbauende Aktivitäten in Rattenorganhomogenaten

Um die Ergebnisse der Versuche 2 und 3 zu überprüfen, wurden zuletzt Versuche mit Insulin-Proinsulin-Gemischen gemacht.
Das Gemisch wurde zu gleichen Teilen aus einer Insulinlösung, die ca. 100 µE/ml und einer Proinsulinlösung, die ca. 60 µE/ml enthielt,

hergestellt. Man erhielt auf diese Weise ein 3 : 5 Proinsulin : Insulin Gemisch.

Der Ausgangswert des Lösungsgemisches war für die Versuche mit Muskelzentrifugat 76,5 µE/ml, für die mit Leberzentrifugat 81,0 µE/ml. Nach 30' Inkubation war bei den Versuchen mit Muskelgewebe noch 47,7 % der radioimmunologisch meßbaren Aktivität vorhanden, bei den Versuchen mit Leberzentrifugat noch 36,4 %.

Wenn man berücksichtigt, daß bei unseren Versuchen das Lebergewebe ca. 97 % reines Insulin und ca. 25 % reines Proinsulin zerstört (siehe Abbildung 5), so bleiben rechnerisch nach Inkubation noch 1,5 µE Insulin und 22,5 µE Proinsulin, zusammen also 24 µE IMM übrig, d.h. noch 30 % der ursprünglichen Aktivität. Experimentell ermittelt: 36,4 %.

Die Immunoreaktivität nach Inkubation korrespondiert also sehr gut sowohl mit der zugefügten Proinsulin- als auch der Insulinmenge.

bei Muskelgewebe ca. 90 % Insulinzerstörung
ca. 10 % Proinsulinzerstörung (Abb 5)

76 µE Gemisch < 47,5 µE Insulin — 4,7 µE
28,5 µE Proinsulin — 25,7 µE nach Inkubation
30,4 µE Rest
≙ 40 % der ursprünglichen Aktivität (rechnerisch);
experimentell: 47,7 %.

(Abbildungen 4, 5, 6, Tabellen 4d und 4d)

Milz

Tabelle 1

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a) µE/ml	%	5' µE/ml	%	10' µE/ml	%	15' µE/ml	%	20' µE/ml	%	30' µE/ml	%
1	86,0	100	10,0	11,6	10,0	11,6	10,0	11,6	7,5	8,7	3,0	3,4
2	98,0	100	20,5	20,9	9,5	9,6	-	-	5,0	5,1	5,0	5,1
3	86,0	100	20,0	23,2	11,5	13,7	5,0	5,8	5,0	5,8	5,5	6,5
4	100,0	100	17,0	17,0	4,5	4,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
5	100,0	100	53,0	53,0	40,0	40,0	39,5	39,5	31,5	31,5	16,5	16,5
6	100,0	100	84,5	84,5	75,0	75,0	59,5	59,5	46,0	46,0	30,0	30,0
Mittelwert	95,0	100	34,1	35,0	25,0	25,6	23,5	23,9	16,4	16,7	10,5	10,8
±σ	7,0	0	28,8	28,2	27,5	27,1	24,8	24,5	17,9	17,7	10,7	10,5
	Patientenserum b)											
1	57,0	100	38,5	67,5	14,0	24,5	8,5	14,9	3,5	6,1	2,5	4,3
2	57,0	100	33,5	58,7	12,5	21,9	12,5	21,9	-	-	11,5	20,1
3	57,0	100	37,0	64,9	22,5	39,4	22,5	39,4	13,5	23,6	-	-
4	57,0	100	33,5	58,7	17,0	29,8	14,0	24,5	13,0	22,8	9,0	15,7
5	57,0	100	46,0	80,7	47,5	83,3	31,5	55,2	27,0	47,3	22,5	39,4
6	77,0	100	63,5	82,4	58,5	75,9	36,0	46,7	18,5	24,0	19,5	25,3
Mittelwert	60,3	100	42,3	68,8	28,6	45,8	20,8	33,8	15,1	24,8	13,0	21,0
±σ	8,1	0	11,2	10,5	19,4	26,9	11,0	15,7	8,5	14,6	8,0	12,8

Tabelle 1: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung und
b) in Patientenserum vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37°C mit zentrifugiertem Milzhomogenat (25 µl).

Leber

Tabelle 2

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a) µE/ml	%	5' µE/ml	%	10' µE/ml	%	15' µE/ml	%	20' µE/ml	%	30' µE/ml	%
1	121,0	100	15,0	12,3	-	-	6,0	4,9	6,0	4,9	3,0	2,4
2	64,5	100	2,0	3,1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	52,5	100	6,5	12,3	2,0	3,8	1	1	1	1	1	1
4	100,0	100	27,0	27,0	14,0	14,0	7,5	7,5	6,0	6,0	4,5	4,5
5	87,5	100	7,5	8,5	6,5	5,7	5,7	5,7	5,0	5,7	5,0	5,7
Mittelwert	85,1	100	11,6	12,6	5,8	6,5	4,1	4,0	3,8	3,7	2,9	2,9
±σ	27,4	o	9,7	8,8	5,9	5,6	2,9	2,9	2,5	2,5	1,9	2,1
	Patientenserum b)											
1	53,5	100	16,5	30,8	15,0	28,0	11,0	20,5	12,0	22,4	-	-
2	77,0	100	24,0	31,1	20,0	25,9	18,5	24,0	18,5	24,0	18,5	24,0
3	100,0	100	49,0	49,0	-	-	31,5	31,5	23,5	23,5	19,5	19,5
4	77,0	100	41,0	53,2	19,5	25,3	12,5	16,2	8,0	10,3	7,0	9,0
5	61,0	100	42,5	69,6	19,0	31,1	15,5	25,4	6,5	10,6	5,5	9,0
MW	75,7	100	34,6	46,7	18,3	27,6	17,8	23,5	13,7	18,1	12,5	15,4
±σ	16,64	0	13,6	16,3	2,3	2,6	8,8	5,6	7,1	7,0	7,5	7,5
	Reines Proinsulin c)											
1	57,0	100	53,0	92,7	51,5	90,1	50,5	88,3	48,0	84,0	40,0	70,0
2	57,0	100	56,0	97,0	53,5	93,6	49,5	86,6	50,0	87,5	46,0	80,3
MW	57,0	100	54,5	94,8	52,5	92,8	50,0	87,4	49,0	85,7	43,0	75,1
±σ	0	0	2,1	3,0	1,4	2,4	0,7	1,2	1,4	2,4	4,2	7,2
	Insulin Insulin Gemisch Pro- d)											
1	81,0	100	42,0	51,6	37,5	46,1	36,5	44,8	35,0	43,0	29,5	36,2
2	81,0	100	42,5	52,2	38,0	46,7	34,5	42,4	32,0	39,3	29,5	36,2
MW	81,0	100	42,2	51,9	37,7	46,4	35,5	43,6	33,5	41,1	29,5	36,2
±σ	0	0	0,3	0,4	0,3	0,4	1,4	1,6	2,1	2,6	0	0

Tabelle 2: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung
b) in Patientenserum
c) in reiner Proinsulinlösung, und
d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37°C mit zentrifugiertem Leberhomogenat

N i e r e

Tabelle 3

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a) µE/ml	%	5' µE/ml	%	10' µE/ml	%	15' µE/ml	%	20' µE/ml	%	30' µE/ml	%
1	98,0	100	38,5	39,2	18,0	18,3	11,0	11,2	9,5	9,6	4,5	4,5
2	86,0	100	21,5	25,0	17,0	19,7	17,0	19,7	10,0	11,6	7,5	8,7
3	86,0	100	29,0	33,6	22,5	26,1	20,5	23,8	11,5	13,3	5,0	5,8
4	100,0	100	26,5	26,5	22,0	22,0	9,0	9,0	6,5	6,5	7,5	7,5
5	100,0	100	46,5	46,5	34,5	34,5	25,0	25,0	14,0	14,0	6,0	6,0
MW	94,0	100	32,4	34,1	22,8	24,1	16,5	17,7	10,3	11,0	6,1	6,5
±σ	7,3	0	10,0	8,9	6,9	6,5	6,6	7,2	2,7	3,0	1,3	1,6
	Patientenserum b)											
1	87,0	100	25,5	29,3	23,5	27,0	19,0	21,8	14,0	16,0	14,0	16,0
2	53,5	100	22,5	42,0	19,0	35,5	15,0	28,0	15,0	28,0	15,0	28,0
3	57,0	100	18,0	31,5	13,5	23,6	8,5	14,9	8,0	14,0	5,0	8,7
4	57,0	100	30,0	52,6	18,5	32,4	8,5	14,9	-	-	7,5	13,1
5	57,0	100	30,0	52,6	22,5	39,4	-	-	17,0	29,8	13,5	23,6
6	57,0	100	31,5	55,2	19,0	33,3	12,0	21,0	8,0	14,0	-	-
MW	61,4	100	26,1	43,8	19,3	31,9	12,6	20,1	12,4	20,4	11,0	17,9
±σ	12,6	0	5,2	11,4	3,5	5,7	4,4	5,5	4,1	7,8	4,4	7,8

Tabelle 3: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung bzw.
b) in Patientenserum vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37°C mit zentrifugiertem Nierenhomogenat (25 µl).

M u s k e l

Tabelle 4

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a) µE/ml	%	5' µE/ml	%	10' µE/ml	%	15' µE/ml	%	20' µE/ml	%	30' µE/ml	%
1	100,0	100	22,5	22,5	18,5	18,5	17,5	17,5	15,5	15,5	12,5	12,5
2	100,0	100	50,0	50,0	44,0	44,0	26,0	26,0	25,0	28,0	15,0	15,0
3	87,5	100	29,0	32,0	27,5	31,4	25,0	28,5	25,0	28,5	12,0	13,7
4	87,5	100	31,5	36,0	27,5	31,1	11,5	13,1	9,5	10,8	1	1
5	124,0	100	29,5	23,3	15,0	12,0	7,5	6,0	7,5	6,0	8,0	6,4
MW	99,9	100	32,5	32,8	26,5	27,4	17,5	18,2	16,5	17,1	9,7	9,7
±σ	14,9	0	10,3	11,1	11,2	12,4	8,0	9,2	8,2	9,4	5,4	5,8
	Patientenserum b)											
1	87,0	100	37,0	43,5	-	-	32,0	36,7	22,5	25,8	20,5	23,5
2	53,5	100	42,0	78,5	31,5	58,8	24,5	45,7	18,05	33,6	18,0	33,6
3	57,0	100	36,0	63,1	24,0	42,1	25,0	43,8	24,0	42,1	13,5	23,6
4	42,5	100	35,5	83,5	26,0	61,1	22,5	52,9	15,0	35,2	10,0	23,5
5	106,5	100	53,5	50,2	35,5	33,3	21,5	20,1	1	1	1	1
6	89,0	100	74,0	83,1	23,5	26,4	18,5	20,7	15,0	16,8	14,0	15,7
MW	72,5	100	46,3	67,0	28,1	44,3	24,0	36,7	15,9	25,7	12,8	20,1
±σ	25,0	0	15,1	17,3	5,2	15,3	4,5	13,5	8,2	14,9	6,8	11,0
	Reines Proinsulin c)											
1	60,5	100	60,5	100	61,5	101,4	56,5	93,2	-	-	55,0	90,7
2	60,5	100	-	-	59,5	98,1	59,5	98,1	54,5	89,9	53,5	88,2
MW	60,5	100	60,5	100	60,5	99,7	58,0	95,6	54,5	89,9	54,2	89,4
±σ	0	0	0	0	1,4	2,3	2,1	3,4	0	0	1,0	1,7
	Insulin Proinsulingemisch d)											
1	76,5	100	61,5	80,5	55,0	70,0	50,0	65,5	4o,5	53,0	36,5	47,8
2	76,5	100	58,5	76,6	57,0	74,6	50,0	65,5	44,5	58,2	36,0	47,1
MW	0,0	0	60,0	78,5	56,0	72,3	50,0	65,5	42,5	55,6	36,2	47,4
±σ	0	0	2,1	2,7	1,4	3,2	0	0	2,8	3,6	0,3	0,5

Tabelle 4: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung
b) in Patientenserum
c) in reiner Proinsulinlösung und
d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach verschieden langer Inkubation bei 37°C mit zentrifugiertem Muskelhomogenat (25 µl).

M i l z

Tabelle I

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a)		25 µl		50 µl		100 µl	
	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%
1	86,0	100	7,5	8,7	7,5	8,7	10,5	12,2
2	86,0	100	5,0	5,8	4,0	4,6	8,0	9,3
3	100,0	100	40,0	40,0	35,5	35,5	30,0	20,0
4	100,0	100	59,5	59,5	57,5	57,5	66,5	66,5
MW	93,0	100	28,0	28,3	26,1	26,5	28,7	29,5
±σ	8,0	0	26,3	25,6	25,2	24,7	27,0	26,3
	Patientenserum b)							
1	57,0	100	22,5	39,4	17,5	30,7	15,0	26,3
2	57,0	100	13,0	22,8	9,0	15,7	9,0	15,7
3	57,0	100	8,5	14,9	11,0	19,2	10,0	17,5
MW	57,0	100	14,6	25,7	12,5	21,9	11,3	19,8
±σ	0	0	7,1	12,5	4,4	7,8	3,2	5,6

Tabelle I: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung und
b) in Patientenserum vor und nach Inkubation (37°C)/15') bei Zugabe von Milzhomogenat in verschiedenen Mengen (25,50,100 µl).

L e b e r

Tabelle II

Versuch Nr.	Reines Insulin a)		25 µl		50 µl		100 µl	
	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%
1	121,0	100	5,0	4,1	3,0	2,4	5,0	4,1
2	64,5	100	1	1	1	1	1	1
3	52,5	100	1	1	1	1	1	1
4	98,0	100	21,0	21,4	10,5	10,7	1	1
5	100,0	100	7,5	7,5	6,0	6,0	7,5	7,5
6	87,5	100	5,0	5,7	3,0	3,4	5,0	5,7
MW	87,2	100	6,7	6,7	4,0	4,1	3,4	3,3
±σ	25,0	0	7,4	7,6	3,6	3,7	2,8	2,8
	Patientenserum b)							
1	77,0	100	16,5	21,4	16,5	21,4	18,5	24.0
2	100,0	100	31,5	31,5	26,0	26,0	21,0	21,0
3	77,0	100	8,0	10,3	7,5	9,7	6,0	7,7
MW	84,6	100	18,6	21,1	16,6	19,0	15,1	17,6
±σ	13,3	0	11,9	10,5	9,2	8,3	8,0	8,6
	Reines Proinsulin c)							
1	57,0	100	50,5	88,3	48,0	84,0	45,5	79,6
2	57,0	100	49,5	86,6	47,5	83,1	-	-
MW	57,0	100	50,0	87,4	47,7	83,5	45,5	79,6
±σ	0	0	0,7	1,2	0,3	0,6	0	0
	Gemisch: Insulin/Proinsulin d)							
1	81,0	100	32,0	39,3	37,0	45,5	34,5	42,4
2	81,0	100	36,5	44,8	34,5	42,4	33,0	40,5
MW	81,0	100	34,2	42,0	35,7	43,9	33,7	41,4
±σ	0	0	3,1	3,8	1,7	2,1	1,0	1,3

Tabelle II: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung
b) in Patientenserum
c) in reiner Proinsolinlösung und
d) in einem Insolin- Proinsulingemisch vor und nach Inkubation (37°C/15') bei Zugabe verschiedener Mengen von Leberhomogenat (25,50,100 µl).

Niere

Tabelle III

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a)		25 µl		50 µl		100 µl	
	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%
1	98,0	100	11,0	11,2	8,5	8,6	3,5	3,5
2	86,0	100	17,5	20,3	12,0	13,9	10,0	11,6
3	86,0	100	20,5	23,8	6,5	7,5	4,0	4,6
4	100,0	100	9,0	9,0	6,5	6,5	2,0	2,0
5	100,0	100	25,0	25,0	16,0	16,0	12,5	12,5
MW	94,0	100	16,6	17,8	9,9	10,5	6,4	6,8
±σ	7,3	0	6,7	7,3	4,0	4,2	4,5	4,8
	Patientenserum b)							
1	57,0	100	8,5	14,9	5,0	8,7	8,5	14,9
2	57,0	100	17,0	29,8	12,5	21,9	11,5	20,1
3	57,0	100	12,0	21,0	11,0	19,2	4,5	7,8
4	57,0	100	14,5	25,4	12,0	21,0	8,0	14,9
MW	57,0	100	13,0	22,8	10,1	17,7	8,2	14,4
±σ	0	0	3,6	6,3	3,4	6,1	2,8	5,0

Tabelle III: Immunologisch meßbares Material in
a) reiner Insulinlösung und
b) in Patientenserum vor und nach Inkubation (37°C/15') bei Zugabe verschiedener Mengen 25 µl, 50 µl, 100 µl) von Nierenhomogenat.

Muskel

Tabelle IV

Versuch Nr.	Reines Humaninsulin a)		25 µl		50 µl		100 µl	
	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%	µE/ml	%
1	100,0	100	17,5	17,5	10,5	10,5	6,5	6,5
2	100,0	100	26,0	26,0	22,0	22,0	10,0	10,0
3	87,5	100	27,5	31,4	10,0	11,4	8,5	9,7
4	87,5	100	11,5	13,1	10,0	11,4	11,5	13,1
5	124,0	100	7,5	6,0	4,5	3,6	4,5	3,6
MW	99,8	100	18,0	18,8	11,4	11,7	8,2	8,5
±σ	14,9	0	8,7	10,0	6,4	6,5	2,7	3,6
	Patientenserum b)							
1	57,0	100	25,0	43,8	19,0	33,3	13,5	23,6
2	42,5	100	24,0	56,4	22,5	52,9	16,0	37,1
3	106,5	100	21,5	20,1	20,0	18,7	18,5	17,3
4	89,0	100	18,5	20,7	18,5	20,7	15,0	16,8
MW	73,7	100	22,2	35,3	20,0	31,4	15,7	23,7
±σ	29,2	0	2,9	17,8	1,7	15,7	2,1	9,4
	Reines Proinsulin c)							
1	60,5	100	55,0	90,7	59,0	97,3	59,0	97,3
2	60,5	100	59,5	98,1	59,5	98,1	59,0	97,3
MW	60,0	100	57,2	94,5	59,2	97,7	59,0	97,3
±σ	0	0	3,1	5,3	0,3	0,5	0	0
	Insulin-Proinsulin-Gemisch d)							
1	76,5	100	50,0	65,5	39,5	51,7	35,5	46,5
2	76,5	100	50,0	65,5	43,5	56,9	36,5	47,8
MW	76,5	100	50,0	65,5	41,5	54,3	36,0	47,1
±σ	0	0	0	0	2,8	3,6	0,7	0,9

Tabelle IV: Immunologisch meßbares Material
a) in reiner Insulinlösung
b) in Patientenserum
c) in reiner Proinsulinlösung und
d) in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch vor und nach Inkubation (15'/37°C) bei Zugabe verschiedener Mengen von Muskelhomogenat (25,50,100 µl).

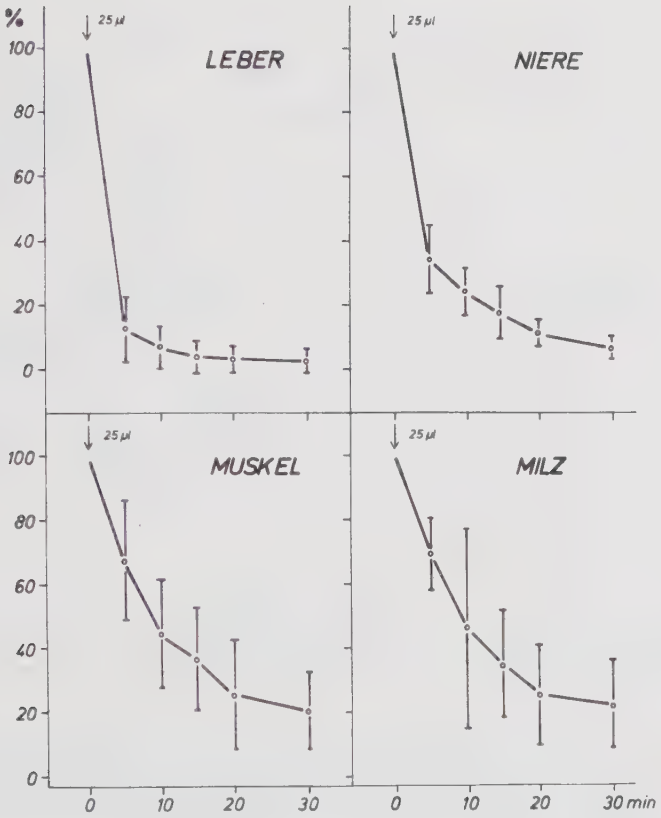

Abb. 3: Abbau des IMM in reiner Insulinlösung durch Leber- und Nierenhomogenat (oben) und in Patientenserum durch Muskel- und Milzhomogenat (jeweils 25 µl) nach verschieden langer Inkubation bei 37° C (5', 10', 15', 20', 30').

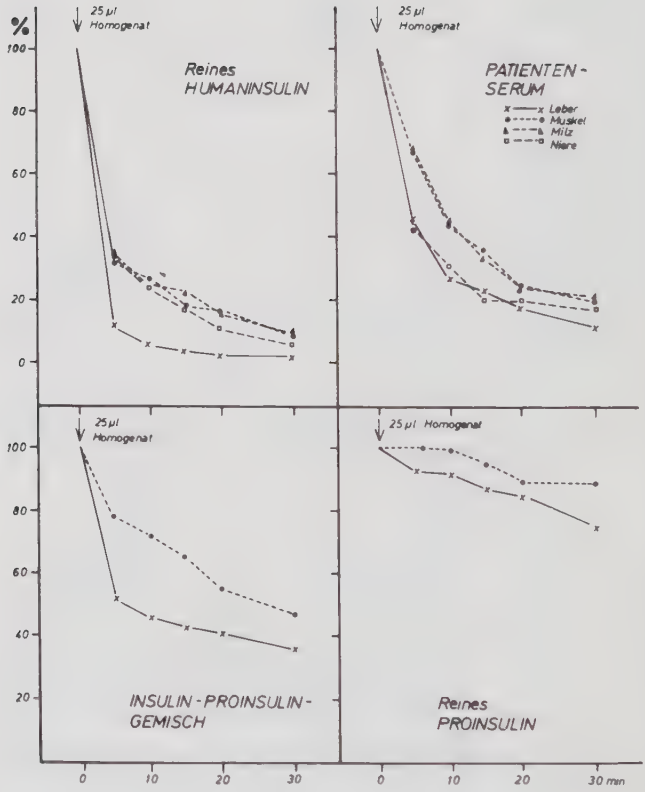

Abb. 4: Abbau des IMM in reiner Humaninsulinlösung, in Patientenserum, in einem Insulin-Proinsulin-Gemisch und in reiner Proinsulinlösung durch die verschiedenen Gewebshomogenate (Leber, Muskel, Milz, Niere) nach verschieden langer Inkubation bei 37° C (5', 10', 15', 20', 30')

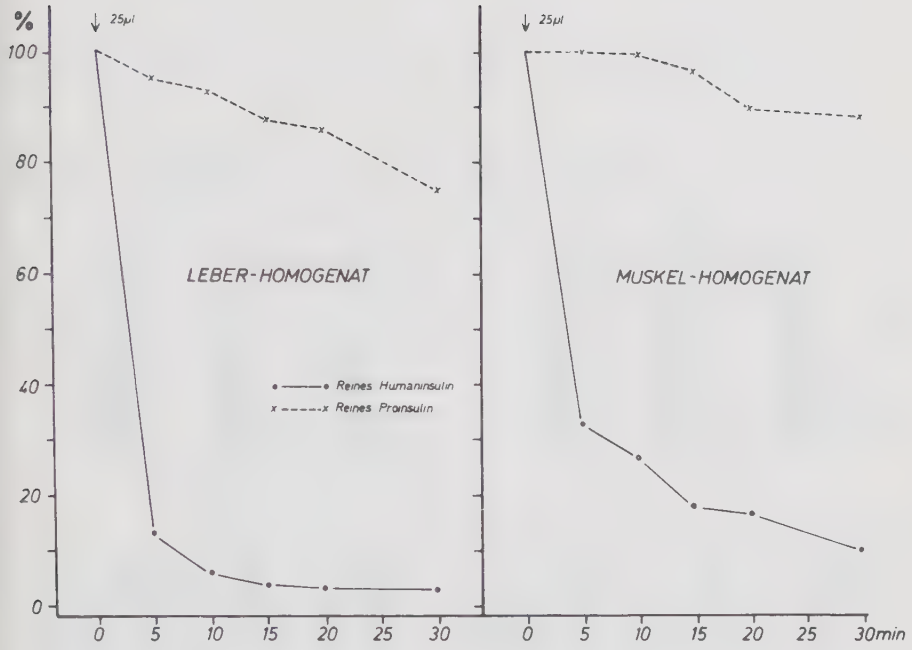

Abb. 5: Abbau des immunologisch meßbaren Humaninsulins und des Proinsulins durch 25 µl Leber- und Muskelhomogenat nach verschieden langer Inkubationszeit (5', 10', 15', 20', 30')

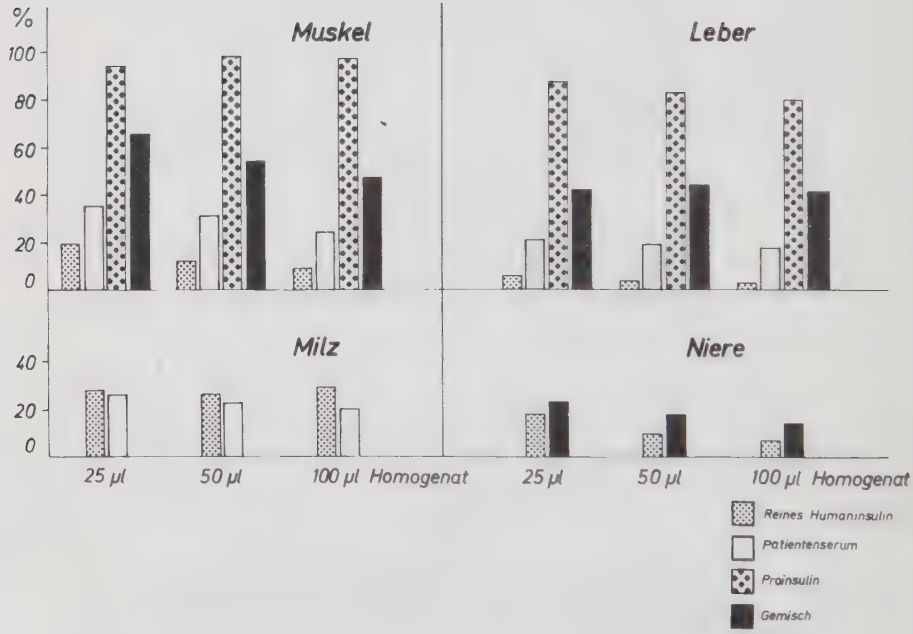

Abb. 6: Abbau des IMM in den verschiedenen Lösungen (Insulinlösung, Patientenserum, Proinsulinlösung, Insulin-Proinsulin-Gemisch) durch die insulinabbauenden Aktivitäten in den verschiedenen Organhomogenaten bei gleicher Inkubationszeit aber verschieden großer Homogenatzugabe (25, 50, 100 µl)

4. Diskussion

4.1. Wege des enzymatischen Insulinabbaus

Die biochemische Natur des insulinabbauenden Enzyms ist noch immer nicht restlos geklärt. Zwei Theorien stehen sich gegenüber (48):

1. Die Insulininaktivierung durch den hydrolytischen Angriff einer oder mehrerer Proteinasen, die entweder spezifisch oder von einem mehr allgemeinen Typ (Kathepsine) sind.
2. Die Insulininaktivierung durch eine Spaltung der Disulfidbrücken. Die dadurch freiwerdenden A- und B-Ketten werden dann einem raschen Abbau durch Proteinasen unterzogen.

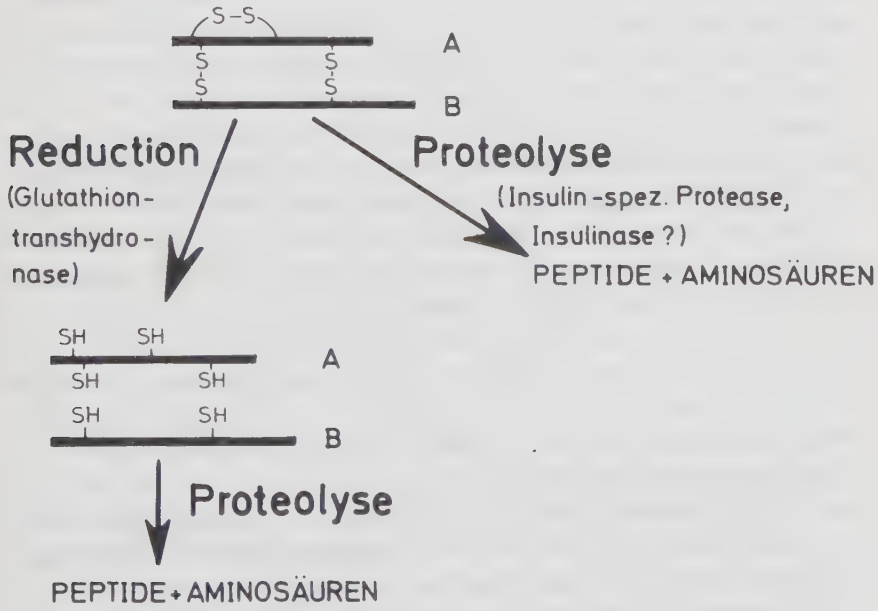

Abb. 7: Schematische Darstellung der Wege des enzymatischen Insulinabbaus (nach H. Thomas (48)).

4.1.1. Die Theorie der insulinspezifischen Protease

Die erste Theorie stammt von Mirsky, der 1949 feststellte, daß die biologische Aktivität von Insulin rasch verlorenging, wenn Hormonlösungen mit Gewebeaufbereitungen von Leber, Niere, Pankreas und Muskel inkubiert wurden. Er beschrieb ein proteolytisches System und nannte das Enzym 'Insulinase'. Er stellte außerdem fest, daß das Enzym zur vollen Aktivitätsentfaltung freie Sulfhydrylgruppen brauchte (35).
1971 beschrieb Brush (2) ein Enzymsystem im Skelettmuskel der Ratte, das in der löslichen Zellfraktion lokalisiert war und spezifisch Insulin durch Proteolyse inaktivierte. Zu dieser Zeit war das Proinsulin als Vorstufe des Insulins schon bekannt (47), und die Beobachtung von Brush eröffnete die Möglichkeit der schnellen Proinsulinbestimmung im menschlichen Serum mit Hilfe dieses insulinspaltenden Enzyms, die dann auch im gleichen Jahr von Kitabchi und Mitarbeitern veröffentlicht wurde (26, 27). Wegen seiner großen Spezifität für Insulin nannten Duckworth, Heinemann und Kitabchi 1972 dieses Enzym 'Insulinspezifische Protease ISP'.
Kitabchi und Stenz (25) wiesen das Enzym in den verschiedensten Geweben der Ratte nach und Burghen, Kitabchi und Brush (5) meinten, daß ISP das Hauptenzym des Insulinabbaus in der Leber ist.
Burghen und andere spekulierten, ob die ISP mit der von Mirsky beschriebenen Insulinase identisch sei, und schlossen, daß zumindest eine sehr große Ähnlichkeit bestand.

4.1.2. Die Theorie der insulinabbauenden Transhydrogenase

Der Proteasentheorie steht die Theorie der "Glutathion-Insulin-Transhydrogenase" gegenüber.
Die Transhydrogenase, 1959 zuerst von Tomizawa und Halsey (50) und von Narahara und Williams (36) beschrieben, katalysiert in Anwesenheit eines Thiols wie z.B. Glutathion (11) die Reduktion der Disulfidbrücken und spaltet dadurch das Insulinmolekül in die A- und B-Kette. Vgl. z. B. Arbeiten von Katzen und Tietze (23), Tonizawa und Varandani (52) und in neuerer Zeit Ansorge u.a. (1).
Das Enzym ist ubiquitär im Rattengewebe vorhanden und laut Chandler

und Varandani (10) besteht eine offensichtlich inverse Beziehung zwischen der Insulinsensibilität eines Gewebes und seinem Gehalt an Transhydrogenase. So enthalten z.B. insulinsensible Gewebe wie Herz, Muskel, Fett niedrige Konzentrationen von GIT, während Gewebe mit relativ geringer Insulinsensibilität, Leber und Niere z.B., höchste GIT-Konzentrationen aufweisen.

4.1.3. Diskussion über die verschiedenen Insulinabbautheorien anhand der Literatur

Zweifel an der Spezifität der GIT hegte selbst Varandani, der bei in vitro Versuchen die Fähigkeit der Transhydrogenase entdeckte, aus getrennten A- und B-Ketten wieder Insulin zu regenerieren indem die Disulfidbrücken von gespaltenem Insulin wiederhergestellt wurden (54).
Kitabchi (25), der ja der Insulinase-Theorie anhängt, gab zu bedenken, daß 1. GIT auch andere Disulfid enthaltende Verbindungen abbaut, daß sie also nicht spezifisch für den Insulinabbau ist, und daß 2. die Menge und die genaue Lokalisation der GIT in verschiedenen Geweben nicht genau bekannt ist. In dem zentrifugierten Gewebsüberstand, den Kitabchi für seine Versuche verwendet, ist jedenfalls kein Glutathion vorhanden, wie Burghen nachwies (5), und es findet trotzdem ein Insulinabbau statt.
Dem steht die Behauptung von Varandani (11) gegenüber, daß in den dialysierten oder teilgereinigten Enzymaufbereitungen von Kitabchi und Mitarbeitern der Insulinabbau auf GIT beruhen könnte, die darin endogene Proteinthiole als Co-Substrate benutzt. Da ja die Transhydrogenase auch die Thiolgruppen der A- und B-Ketten des Insulins als Co-Substrate für den Insulinabbau gebrauchen kann, würde der Abbau weiter vorangehen, wenn er einmal durch eine kleine Menge irgendeines Thiols in Gang gesetzt worden wäre.
Varandani wies nämlich nach, daß Leberhomogenate, aus denen die Transhydrogenase durch Fällung mit Antikörpern spezifisch entfernt worden war, nahezu keine insulinabbauenden Aktivitäten mehr zeigten.

Thomas kommt in seiner Arbeit zu dem Ergebnis, daß in den meisten Geweben zumindest zwei getrennte Enzymsysteme vorhanden und für den Insulinkatabolismus verantwortlich sind. Die relative Beteiligung

der einzelnen Enzyme an dem überall stattfindenden Insulinabbau bleibt dabei Gegenstand der Kontroverse.
Da beide, der reduktive und der proteolytische Weg als Hauptsysteme des Insulinabbaus beschrieben wurden, ist es, laut Thomas, verlokkend zu fordern, daß beide Systeme gleich wichtige Rollen im Insulinkatabolismus spielen:

1. die Transhydrogenase, mit einer relativ hohen K_m (43 μM) (25) bei der Insulinkontrolle bei hohen Hormonspiegeln, und
2. die Protease mit ihrer niedrigen K_m (0,1 μM) (25) als feiner Kontrollmechanismus bei niedrigen Insulinkonzentrationen.

4.2. Eigene Beobachtungen über insulinspaltende Aktivitäten

Wie schon unter 4.1.1. beschrieben, untersuchten wir in Anlehnung an Arbeiten von Kitabchi (25, 26) Gewebshomogenate von verschiedenen Organen der Ratte auf insulinspaltende Aktivitäten.

4.2.1. Anwesenheit von insulinspaltenden Aktivitäten in vier Gewebs- und Organhomogenaten der Ratte

Es wurden vier verschiedene Gewebe der Ratte, nämlich Leber-, Muskel-, Nieren- und Milzhomogenate, auf insulinspaltende Aktivitäten untersucht. Mit unseren Untersuchungsmethoden (Gewebeaufbereitung und Aktivitätsbestimmung) konnte in allen Geweben eine insulinspaltende Aktivität festgestellt werden.

4.2.2. Konzentration der ISA in den Geweben

Die Konzentration der insulinspaltenden Aktivitäten in den einzelnen Organen war allerdings unterschiedlich.
Wie aus Abbildung 4 zu erkennen ist, findet man den größten Abfall des Insulins bei dreißigminütiger Inkubation mit zentrifugiertem Leberhomogenat. Die darin enthaltenen Enzyme bauen das Insulin nämlich bis auf 2,9 % der ursprünglichen Konzentration ab. An zweiter Stelle steht Nierenhomogenat mit einer Restinsulinkonzentration von 6,5 %, an dritter Stelle Muskelhomogenat mit 9,7 % und an vierter Stelle Milzhomogenat mit 10,8 % nicht abgebautem Insulin. Das be-

deutet, daß das insulinspaltende Enzym bei unserer Art der Gewebeaufbereitung im Leberhomogenat in höchster und im Milzhomogenat in niedrigster Konzentration vorliegt. Die zweithöchste Konzentration liegt im Nierenhomogenat, die dritthöchste im Muskelhomogenat vor.

4.2.3. Angriff der "insulinspezifischen Protease" auch auf Proinsulin

Wir waren davon ausgegangen, daß wir es mit einer "insulinspezifischen" Protease zu tun haben. Aus unseren verschiedenen Versuchen, einmal mit reinem Humaninsulin und einmal mit reinem Proinsulin wird nun ersichtlich, daß das Insulin zwar zum größten Teil zerstört wird, daß aber auch ein kleiner Teil des Proinsulins angegriffen wird.
So ersieht man aus Abbildung 4, daß durch Inkubation von reinem Insulin mit Leberhomogenat nach 30' nur noch 2,93 % der ursprünglichen Insulinkonzentration nachweisbar sind. Bei Niere sind noch 6,52 %, bei Muskel noch 9,73 % und bei Milz noch 10,84 % vorhanden.

Aus Abbildung 5 wird deutlich, daß auch Proinsulin abgebaut wird. Bei Inkubation mit Leberhomogenat werden 24,9 %, vom Muskelhomogenat 10,6 % des Proinsulins zerstört.
Die Tatsache, daß auch Proinsulin, wenn auch nur geringfügig, angegriffen wird, könnte zweierlei bedeuten: Einmal, daß die untersuchte Protease doch nicht derartig spezifisch ist, wie sie allgemein beschrieben wird; zum zweiten, daß unsere Gewebeaufbereitungen noch nicht optimal gereinigt sind. Das heißt, daß sie noch andere, z.B. Proinsulin angreifende Aktivitäten enthalten könnten.
Ich werde auf diese Vermutungen noch eingehen.

4.2.4. Die Bedeutung der Inkubationsdauer

Die Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten wurden gemacht, um näheres über die Geschwindigkeit der Insulinspaltung durch das Enzym herauszufinden.
Wenn man dazu die Abbildungen 3 oben und 4 ansieht, stellt man fest, daß die Leberprotease reines Insulin am schnellsten spaltet. Schon nach 10 Minuten ist ihre Kapazität nahezu erschöpft, die wei-

teren 20' Einwirkzeit ergeben keinen wesentlichen Insulinabbau mehr.
Bei den anderen Gewebshomogenaten verläuft die Kurve nicht so steil. Der Insulinabbau scheint also nach 30' noch nicht vollständig abgeschlossen zu sein.
Bei der Inkubation von Patientenserum mit verschiedenen Gewebshomogenaten (Abb. 4, Abb. 3 unten) zeigt das Lebergewebe nicht den Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit wie bei reinem Insulin; hier verlaufen alle Kurven fast gleich steil. Bei allen Geweben scheint der Abbau nach 20' so gut wie abgeschlossen zu sein (Abb. 4).

4.2.5. Die Bedeutung der Enzymmenge

Um eine mögliche Beziehung zwischen der Enzymmenge und der Menge des gespaltenen Insulins herzustellen, wurden Versuche mit wechselnden Homogenatmengen gemacht. Es wurde eine konstante Inkubationsdauer von 15 min bei 37° C beibehalten. Dabei stellte sich bei den Versuchen mit reinem Insulin heraus, daß die von 100 µl Homogenatlösung in 15' abgebaute Menge Insulin - außer beim Milzhomogenat - genau der von 25 µl in 30' abgebauten Menge entsprach. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, findet man auch mit steigender Enzymzugabe keine wesentliche Steigerung des Abbaus mehr.
Mit 25 µl Homogenat ist nach 15 min der Abbau zum größten Teil beendet.
Man kann also zusammenfassend sagen, daß mit einer Menge von 25 µl zentrifugiertem Gewebshomogenat nach 15 - 20 Minuten - bei Leberhomogenat nach ca. 10 Minuten - der Insulinabbau durch die gewebseigenen Enzyme weitestgehend abgeschlossen ist.

4.3. Vergleich eigener Ergebnisse mit denen der Literatur

Einen umfassenden Überblick über insulinspaltende Aktivitäten in den verschiedensten Geweben der Ratte gibt Kitabchi in einer Arbeit (25).
Er untersucht Leber-, Gehirn-, Fett-, Lungen-, Nieren-, Milz-, Herz-, Muskel-, Pankreas-, Hoden-, Ovar- und Nebennierenhomogenate. Die Reihenfolge der Organe mit höchster zu niedrigster Enzymaktivi-

tät ist nach seinen Untersuchungen die folgende: Leber > Pankreas > Niere > Testes > Nebenniere > Milz > Ovar > Lunge > Herz > Muskel > Gehirn > Fett. Nach ähnlichen experimentellen Untersuchungen findet Brush (2) auch, daß Lebergewebe höchste insulinabbauende Aktivität zeigt, es folgen Niere, Fett, Diaphragma, Hinterbeinmuskeln. Diese Untersuchung an reinem Insulin stimmt nicht ganz mit den von uns gefundenen Werten überein. Bei uns ist von den vier untersuchten Geweben die Milz das mit der geringsten Aktivität, wenn auch nur mit sehr wenig Unterschied zum Muskelgewebe.
Dieser Unterschied könnte vielleicht daher rühren, daß die Gewebeaufbereitungen verschieden hoch gereinigt waren. Kitabchi gibt seine Ergebnisse in abgebautem Picomol Insulin pro Minute und Milligramm Protein (der Proteasenlösung) $\frac{\text{pMol Insulin}}{\text{min . mg Protein}}$ an. Die Bestimmung des Proteins in den gereinigten Enzympräparaten geschah dabei nach der Methode von Lowry (31). Er gibt also sehr viel exakter die Proteasenmenge an.
Wir dagegen haben keine Proteinbestimmung in den Gewebshomogenaten gemacht, sondern nur immer mit gleichen Mengen Homogenat<u>lösung</u> gearbeitet.
Es ist also möglich, daß seine Gewebsaufbereitungen höher gereinigt, d.h. höher und sogar standardisiert proteinhaltig sind. Man müßte daher versuchen, durch bessere Aufbereitung der Gewebe einen noch effektiveren Abbau des Insulins zu erreichen, und eventuell sogar dadurch den Proinsulinangriff zu verhindern, denn auch Kitabchi konnte nicht die ausschließliche Spezifität der insulinspaltenden Protease beweisen. Proinsulin wurde auch von seinen Homogenaten angegriffen, wenn auch in etwas geringerem Maße als das bei uns der Fall war. Er sagt z.B., daß außer Niere und Pankreas kein Gewebsextrakt mehr als 10 % immunologisch meßbares Proinsulin spaltet (25). Dabei greift auch sein Leberextrakt Proinsulin stärker an als Muskelextrakt, was mit unseren Werten übereinstimmt. Unsere Werte lagen aber mit ca. 10 % bei Muskel und ca. 25 % bei Leber etwas höher als seine.
In der Arbeit von Brush (2) waren zwar keine genauen Werte über den abgebauten Proinsulinanteil zu erfahren, aber es hieß einmal: "Die Tatsache, daß Proinsulin durch das Enzym <u>nicht wesentlich</u> abgebaut wird ...".

Kitabchi konnte aufgrund seiner exakten Proteinmessung auch eine direkte Abhängigkeit der insulinabbauenden Aktivität von der zugegebenen Enzymmenge nachweisen. Er fand, daß die Aktivität proportional zur zugegebenen Gewebemenge ist.
Was die Schnelligkeit des insulinabbaus betrifft, so sind unsere Ergebnisse den seinen ähnlich: Das Leberhomogenat hat schon nach ca. 8 min das meiste Insulin gespalten, während die Kurve des Muskelhomogenats nach 15' noch keinen asymptotischen Verlauf zeigt, was bedeutet, daß seine insulinspaltenden Möglichkeiten nach 15' noch nicht voll erschöpft sind.

5. Zusammenfassung und Ergebnis der Arbeit

5.1.1. Insulinabbauende Enzyme in verschiedenen Rattengeweben

Ziel der Arbeit war gewesen, die in der Literatur schon oft beschriebenen insulinspaltenden Aktivitäten in verschiedenen Rattengeweben zu untersuchen.
Wir konnten in den von uns untersuchten Geweben: Leber, Muskel, Niere, Milz der Ratte tatsächlich insulinabbauende Aktivitäten feststellen, und zwar in unterschiedlicher Menge. Wir fanden heraus, daß die insulinabbauenden Enzyme in der Leber am höchsten konzentriert sind, fanden aber weiter, daß die von Duckworth aufgestellte Bezeichnung "Insulin specific Protease" (ISP) nicht ganz zutrifft. Wir stellten nämlich bei Untersuchungen an reinem Proinsulin fest, daß auch dieses angegriffen wird, wenn auch wesentlich weniger als Insulin. So erhielten wir bei Leberhomogenat einen Insulinabbau von fast 100 %, während Proinsulin zu 25 % zerstört wurde; bei Muskelhomogenat war Insulin zu 90 %, Proinsulin zu 10 % zerstört worden (Abb. 5).
Auch in der Literatur wurde dieser Effekt auf Proinsulin beschrieben (s.o.) ((Brush (2), Kitabchi u.a. (21, 25, 32))), was uns zu folgenden Fragen veranlaßte: 1. Ist die Protease nicht derartig spezifisch, wie allgemein behauptet wird, oder 2. liegt die Erklärung für den Proinsulinabbau darin, daß unsere Enzymaufbereitungen nicht hoch genug gereinigt sind, d.h. daß sie noch andere Eiweiße enthalten, die Proinsulin abbauen können?
Wir kamen zu dem Schluß, daß letzteres der Fall sein mußte, denn durch besseres Aufbereiten der Gewebe kann man erreichen, daß der Proinsulinschwund geringer wird (26). Durch bessere Gewebeaufbereitung, d.h. exaktere Auftrennung der Zellbestandteile, wie sie zum Beispiel durch Gelfiltration zustande kommt, bei der die zentrifugierten Gewebshomogenate noch über eine Polyacrylamidsäule z.B. Sephadex laufen, wäre es vielleicht möglich, den Insulinabbau durch die gewebseigenen Enzyme noch zu spezifizieren, sodaß weniger oder sogar kein Proinsulin mehr zerstört wird.
Kitabchi z.B. weist in einer Arbeit (26) darauf hin, daß die Art der Enzymaufbereitung von großer Wichtigkeit ist. Man sollte nur

Gewebeaufbereitungen verwenden, die eine Insulinabbaurate von mehr als 90 % haben. Bei uns trifft das z.B. für das Leber- und Nierenhomogenat sehr gut, für Muskel- und Milzhomogenat nur bedingt zu (Abb. 3 oben, 4).

5.1.2. Möglichkeit der Proinsulinbestimmung mit Hilfe insulinspaltender Enzyme

Die letzte Frage, die mir noch wichtig erschien, lautete: Ist diese ISP-Methode zur genauen Proinsulinbestimmung geeignet? Wenn ja, ist sie exakt genug und schnell anwendbar, um im klinischen Labor zur Diagnostik - z.B. der Inselzelltumoren - dienen zu können?
Meiner Meinung nach ist der erste Teil der Frage mit ja zu beantworten. Voraussetzung ist, daß man eine nahezu standardisierte Proteasenlösung, wie oben beschrieben, herstellen kann. Man müßte außerdem vor jedem Versuch an reinem Proinsulin und an reinem Humaninsulin die Protease überprüfen, so daß man dann die im Serum gemessenen Werte an Hand dieser Standardwerte ausrechnen kann. Die ISP-Methode ist laut Kitabchi in der Genauigkeit der erhaltenen Proinsulinwerte den anderen aufwendigeren Methoden gleichzusetzen (26).
Was den zweiten Teil der Frage angeht, so muß man ihn auch bejahen. Für ein Labor, das die radioimmunologische Insulinbestimmung mit der Doppelantikörpermethode durchführt, bedeutet die Proinsulinbestimmung keinen wesentlich größeren Aufwand, da ja nur eine Inkubation von 15' bei sonst gleichem Versuchsablauf hinzukommt. Man könnte die ISP-Methode also sehr wohl zur Diagnostik im klinischen Labor heranziehen. Am besten würde man dann mit zentrifugiertem Leberhomogenat arbeiten, da dieses das Insulin schnell und vollständig spaltet (ca. 100 % in 10 - 15 min).

6. Literaturübersicht

1. Ansorge, Bohley, Kirschke, Langner, Wiederanders, Hanson : Metabolism of Insulin and Glucagon. GIT from Microsomes of Rat Liver. European J. Biochem., 32:27 1973

2. Brush : Purification and Characterization of a Protease with Specifity for Insulin from Rat Muscle. Diabetes, Vol. 20, No. 3, 140-45 1971

3. Brush : Insulin Specific Protease (ISP) from Rat Liver. Modifiers and Inhibitors. Fed. Proc. 32:503 1973

4. Brush : Purification and Characterization of Inhibitors of Insulin Specific Protease in Human Serum. Biochem. and Biophys. Res. Comunications, Vol. 53, No. 3 1973

5. Burghen, Kitabchi, Brush : Purification and Properties of a Rat Liver Protease with Specifity for Insulin. Endocrinology 91:633 1972

6. Chajek, Tannenbaum, Shapira, Spitz, Russel, Rabin : Biologic Activity of Proinsulin in an Isolated Fat-Cell-System. Isreal J. Med. Sci., Vol. 8, No. 6 1972

7. Challoner : Degradation of Porcin Insulin and Proinsulin by Rat Adipose Tissue. Diabetes 20:276-81 1971

8. Chance : Amino Acid Sequences of Proinsulin and Intermediates. Diabetes 21 (Suppl. 2): 461-67 1972

9. Chance, Ellis, Bromer : Porcine Proinsulin: Characterization and Amino Acid Sequence. Science 161:165-67 1968

10. Chandler, Varandani : Insulin Degradation II. Biochimica et Biophysica acta 286: 136 1972

11. Chandler, Varandani : Insulin Degradation VIII. Biochimica et Biophysica Acta 320:258-66; 1973

12. Clark, Steiner : Studies of Insulin Biosynthesis in the Rat and the Demonstration of two Proinsulins. Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 62: 278-85 1969

13. Frerichs : Proinsulin und verwandte Proteine Monokomponent-Insulin. Arbeitsgespräch Novo Mainz 1970

14. Galloway, Root, Chance, Rathmacher, Challoner, Shaw : In Vivo Studies of the Hypoglycemic Activity of Porcine Proinsulin. Diabetes 18, Suppl. 1, 341 1969

15. Gordon, Sherman, Roth : "Big" Insulin (Circulating Proinsulin-like Components): A High Proportion of the Basal Insulin. Diabetes 19, Suppl. 1, 360 1970

16. Gutman, Lazarus, Penhos, Recant : Proinsulin and Proinsulin-like Materials in Serum of Patients with Islet Cell Tumors. Diabetes 19, Suppl. 1, 360 1970

17. Gutman, Lazarus, Recant : Electrophoretic Characterization of Circulating Human Proinsulin and Insulin. Diabetologica, 8:136 1972

18. Hales, Randle : Double Antibody Method (Insulinbestimmung). Lancet, i, 200 1963 Biochem. J. 88, 137 1963

19. Hausmann : Radioimmunologische Insulinbestimmung für die Klinik. Diagnostik, 7:21 1974

20. Hinz, Schatz, Maier, Pfeiffer : Die Bedeutung der Proinsulinbestimmung im Serum für die Diagnostik von β-Zelltumoren. 8. Kongress d. dtsch. Diabetesgesellschaft, 21.-23. Juni 1973 München, S. 248

21. Izzo, Roncone, Izzo : Degradation of ^{131}J Proinsulin and ^{131}J Insulin by Rat Liver, Kidney, and Muscle Extracts. Fed. Proc. 30:193 1971

22. Katz, Rubinstein : Metabolism of Proinsulin, Insulin and C-Peptide in the Rat. J. Clin. Invest. 52: 1113-21 1973

23. Katzen, Tietze : Studies on the Specifity and Mechanism of Action of Hepatic Glutathione-Insulin Transhydrogenase. J. Biol. Chem., 241:3561-70 1966

24. Kemmler, Peterson, Steiner : Die Umwandlung von Proinsulin in Insulin in vivo und in vitro. 7. Kongress d. dtsch. Diabetesgesellschaft, 4.-6. Mai 1972 Bad Nauheim 1972, S. 86

25. Kitabchi, Stentz : Degradation of Insulin and Proinsulin by Various Organ Homogenates of Rat. Diabetes, Vol. 21:1091 1971

26. Kitabchi, Duckworth, Brush, Heinemann : Direct Measurement of Proinsulin in Human Serum by the Use of an Insulin-Degrading Enzyme. J. Clin. Invest., Vol. 50, No. 9, 1792-99 1971

27. Kitabchi, Duckworth, Solomon, Brush : Insulin Specific Protease (ISP): A Potential Tool for Direct Measurement of Proinsulin in Human Plasma. Diabetes 19, Suppl. 1, 361 1970

28. Kohnert, Ziegler, Zühlke, Fiedler : Isoelectric Focusing of Proinsulin and Intermediate in Polyacrylamide Gel. FEBS-letters, Vol. 28, Nr. 2 1972

29. Kumar, Miller : Proinsulin-Specific Antibodies in Human Sera. Diabetes Vol. 22:361-66 1973

30. Lazarus, Tanese, Recant : Proinsulin andInsulin Synthesis and Release by Human Insulinoma. Diabetes 18, Suppl. 1, 340 1969

31. Lowry, Rosebrough, Farr, Randall : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193:265-75 1951

32. Mashiter, King : Changes of Immunoreactivity of Proinsulin induced by Rat Tissue Extracts. Nature Vol. 224:696-97 1969

33. Melani, Rubinstein, Steiner : Proinsulin and C-Peptide in Human Serum.
Handbuch des Diabetes Mellitus, Band II 1971

34. Melani, Oyer, Rubinstein, Steiner : Identification of Proinsulin and C-Peptide in Human Serum with a Specific Immunoassay.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 67: 148-55 1970

35. Mirsky : Insulinase, Insulinase-Inhibitors and Diabetes Mellitus.
Recent Progr. Hormone Res., 13: 429-72 1957

36. Narahara, Williams : Reduction of Insulin by Extracts of Rat Liver.
J. Biol. Chem. 234,71 1959

37. Petersen, Heilmeyer, Kieling, Kerp : Zur Proinsulin- und Proglucagonsynthese in EMC-Virus infizierten mikrodissezierten Langerhans'schen Inseln der Maus.
8. Kongress d. dtsch. Diabetesgesellschaft, 21.-23. Juni 1973 München, S. 59

38. Puchinger, Tijoe, Wacker : Hemmung der Proinsulin- und RNS-synthese durch Tolbutamid an isolierten Langerhans'schen Inseln.
7. Kongress d. dtsch. Diabetesgesellschaft, 4.-6. Mai 1972, Bad Nauheim, S. 259

39. Rastogi, Sinha, Dash : Insulin and Proinsulin Content of Pancreases from Diabetic and Nondiabetic Subjects.
Diabetes Vol. 22, No. 11:804-7 1973

40. Rees, Madison : The Effect of Proinsulin on Hepatic Glucose Output, Arterial Glucose and Free Fatty Acid Concentrations in Dogs.
Diabetes 18, 341 1969 - Abstract, Suppl. 1

41. Roth, Gordon, Pastan : "Big Insulin" a Component of Plasma Insulin detected by Immunoassay.
Roc. Nat. Acad. Sci. 61:138-45 1968

42. Rubinstein, Cho, Steiner : Evidence for Proinsulin in Human Urine and Serum. Lancet I, 1353-55 1968

43. Sørensen, Shank, Lindall : Effect of pH on Conversion of Proinsulin to Insulin by a Subcellular Fraction of Rat Islets. Proc. Soc. Experimental Biol. 139: 652-55 1972

44. Sönksen, Tompkins, Srivastava, Nabarro : A Comparative Study on the Metabolism of Human Insulin and Porcine Proinsulin in Man. Clin. Science and Molecular Medicine 45:633-54 1973

45. Steiner : Proinsulin. Triangel Band 11, No. 2 1972

46. Steiner, Clark : The Spontaneous Reoxidation of Reduced Beef and Rat Proinsulin. Proc. Nat. Acad. Sci., 60:622-26 1968

47. Steiner, Oyer : The Biosynthesis of Insulin and a Probable Precursor of Insulin by a Human Islet Cell Adenoma. Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 57:473 1967

48. Thomas : The Role of 'Insulinase' in the Degradation of Insulin. Postgraduate Med. J., 49:940-44 1973

49. Tomizawa u.a. : The Mode of Inactivation of Insulin by Rat Liver Extracts. J. Biol. Chem. 214:285-94 1955

50. Tomizawa, Halsey : Isolation of an Insulin-Degrading Enzyme from Beef Liver. J. Biol. Chem., 234:307-10 1959

51. Tomizawa : Mode of Action of an Insulin-Degrading Enzyme from Beef Liver. J. Biol. Chem., 237:428-31 1962

52. Tomizawa, Varandani : Glutathioneinsulin Transhydrogenase of Human Liver. J. Biol. Chem. 240:3191 1965

53. Varandani : Insulin Degradation VI. Diabetes, Vol. 23, No. 2:117-25 1974

54. Varandani : Acceleration of Regeneration of Insulin Activity from its Inactive Reduced A and B Chains by Pancreatic GIT.
Biochimica et Biophysica Acta, 132:10 1967

55. Yip : A Bovine Pancreatic Enzyme Catalysing the Conversion of Proinsulin to Insulin.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 68: 1312-15 1971

56. Yip, Logothetopoulos : A Specific Antiproinsulin Serum and the Presence of Proinsulin in Calf Serum.
Proc. Nat. Acad. Sci., 62:415-19 1969

57. Yu, Stephen, Kitabchi : Biological Activity of Proinsulin and Related Polypeptides in the Fat Tissue.
J. Biol. Chem., 218:3753-61 1973

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich es nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. H. Kaffarnik für die Übernahme des Correferates und Herrn Priv. Doz. Dr. L. Hausmann für die Übernahme des Referates zu danken.

Ich fühle mich Herrn Priv. Doz. Dr. L. Hausmann auch deshalb besonders zu Dank verpflichtet, weil er mir das Thema überließ und meine Arbeit in Form von Ratschlägen, Hinweisen und Anregungen sehr freundlich unterstützte.

Lebenslauf

Am 6.3.1951 wurde ich als erstes von fünf Kindern des Dr. med. Adam-Josef Kamps und seiner Ehefrau Ine, geborene Schorn in Anrath/Rhld. geboren.
Ab April 1957 besuchte ich die Volksschule in Neersen/Rhld. Im April 1961 bestand ich die Aufnahmeprüfung im städtischen neusprachlichen Mädchengymnasium in Viersen/Rhld. Dort machte ich im Juni 1969 mein Abitur.
Im Wintersemester 1969/70 war ich für Chemie und Ernährungswissenschaften an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn eingeschrieben, da ich noch keine Zulassung zum Medizinstudium bekommen hatte.
Vom Sommersemester 1970 an studierte ich dann an der Marburger Philipps-Universität Medizin.
Das medizinische Staatsexamen werde ich im Sommer 1975 ablegen.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Bauer	Hamelmann	Multsch
Buchholz	Hardewig	Petry
Daume	Heß	Portig
Denicke	Hort	Pots
Dimroth	Jacob	Reim
Dittrich	Kaffarnik	Richter
Dölle	Karlson	Rodeck
Eißner	Klaus	Rohen
Eschenbach	Kleinsasser	Schmid
Exner	Koecke	Seidel
Friederich	Koransky	Siegel
Ganz	Linneweh	Siegert
Golenhofen	Maroske	Thoenes
Graul	Martini	Walcher
Haberich	Niemeyer	Welge-Lüssen
		Willenbockel